

ций, также как и положительный результат в РТГА с пробами из района Памир. При этом данные, полученные в ИФА при исследовании проб от не вакцинированной птицы по районам Вахдат, Рашт, Шахри-
SUMMARY

From October, 2008 up to January, 2009 103 probes of sera from the hens based at the integrated poultry farms and avian facilities various regions of Republic Tadjikistan were tested with purpose to reveal antibodies to avian influenza H5N1 in HI and ELISA. Nonvaccinated poultry from several regions (Vakhdat, Rasht, ShakhriNAV) also were tested. Data received in HI and ELISA shows circulation of strains virus H5N1, which were nonpathogenic into absence of outbreaks in regions. In regions Pamir, Chillikul, Kابدodijan, Varzob and Faisabad this results received positive that may be explained by vaccination of poultry.

Литература

1. Aleksandr S. Lipatov, Scott Krauss, Yi Guan, Malik Peiris, Jerold E. Rehg, Daniel R. Perez and Robert G. Webster. Neurovirulence in Mice of H5N1 Influenza Virus Genotypes Isolated from Hong Kong Poultry in 2001. // Journal of Virology, Mar. 2003, Vol. 77, No. 6, p. 3816 – 3823.
2. Кельмик Д. У. Грипп (чума) птиц. // Болезни домашних и сельскохозяйственных животных. // Москва – изд. Аквариум – 2003. С. 679-690.
3. Конопаткин А. А., Бакулов И. А., Нуйкин Я. В., и др. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных. // Москва - Изд. Колос - 1983. С. 461 - 466.
4. Луговская Н. Н., Циванюк М. А., Фролов С. В., Мудрак Н. С., Дрыгин В. В., Борисов А. В. Комплексное

использование серологических методов для обнаружения антител к вирусу гриппа H5 в сыворотках крови диких и домашних птиц. // Ветеринарный консультант № 20 (135), октябрь 2006. С. 19 - 21.

5. Салимов Т. М., Фатхудинова М. Ф., Тиллоев Т. Обзор: Грипп птиц в Таджикистане. // ДУШАНБЕ, 2008. С. 247 - 251
6. Сюрин В. Н., Самуйленко А. Я., Соловьев Б. В., Фомина Н. В. Вирусные болезни животных. // Москва, ВНИТИБП, 1998. С. 333.
7. Тихонов З. В. Развитие учений об инфекционных болезнях животных и птичьем гриппе (исторический аспект). // Москва - Изд. ЮгоВосток - Сервис - 2006. С. 22 - 25.

УДК: 579.252.55:615.332:579.25:577.212.3

В.И. Семенихин, А.С. Донченко, С.А. Юрик

(Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, п. Краснообск, Новосибирская область)

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ ГНЕЗДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Некробактериоз – широко распространенное инфекционное заболевание, которым болеют все виды животных и птиц, а также и человек. Первичным агентом в возникновении данного заболевания является *Fusobacterium necrophorum* – грамотрицательная, полиморфная, неподвижная палочка, растущая в строго анаэробных условиях, не образующая спор и капсул. Болезнь причиняет экономический ущерб из-за снижения многих показателей, в том числе молочной продуктивности на 5–25%, интенсивности роста на 15–25% [1–3].

Основным способом лабораторной диагностики некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота в настоящее время является бактериологическое исследо-

вание: микроскопия мазка, посев на питательные среды, биопроба на лабораторных животных. Эти методы диагностики имеют свои минусы. Так, из очагов поражения наряду с *Fusobacterium necrophorum*, обладающей вирулентностью, выделяют и неvirulentные биотипы: *Fusobacterium pseudonecrophorum*, находящиеся в рубце, а также атипичные формы, которые никогда не вызывают заболевание, но по морфологическим признакам очень схожи с вирулентными вариантами. Одновременно в больших количествах выделяется сопутствующая микрофлора: стафилококки, стрептококки, микрококки, картофельная, кишечная палочки и другие микроорганизмы. Поэтому выделить возбудителя заболевания сложно. В целом на постанов-

ку диагноза затрачивается 12–16 суток, а в случае значительного обсеменения биологических образцов вульгарной микрофлорой это время увеличивается на 6–10 дней.

В настоящее время наиболее чувствительными и специфичными признаны методы, основанные на выявлении фрагментов генома возбудителя в биологическом материале с помощью полимеразной цепной реакции. Этот метод позволяет обнаружить возбудителя при очень низких его концентрациях и сократить сроки диагностических исследований в 8–10 раз в сравнении с бактериологическими методами.

Материал и методы

Биологические образцы для исследований отбирали по клиническим показаниям: хромота, язвы между пальцами с серым налетом и неприятным запахом, свищи в копытном роге с гнойным истечением или без него. Выделение культур *F. necrophorum* проводили согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза животных» [4]. Также в своей работе использовали культуры *F. necrophorum*, выделенные от животных из разных регионов Западно-Сибирского и Приволжского округов сотрудниками лабораторий по изучению некробактериоза животных ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии и Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (ВНИВИ, г. Казань) и переданные в лабораторию генной инженерии ИЭВСиДВ. В качестве известных использовали культуры *F. necrophorum* № 3430 и № 2, выделенные соответственно во ВГНКИ и ВИЭВ.

Для проверки специфичности полимеразной цепной реакции использовали референтные штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pyogenes* (гр. А), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* (полевой штамм), *Bacillus subtilis* ТНП-3, *Salmonella dublin* 373 315/52, представленные сотрудниками лаборатории по изучению болезней молодняка ГНУ ИЭВ-СиДВ.

Выделение геномной ДНК возбудителя из биологических образцов проводили в двух вариантах: в первом – депротеинизацию суммарной ДНК проводили с помощью протеиназы К (10 мг/мл) с последующей экстракцией смесью фенол-хлороформа (1:1) и осаждением этанолом, во втором – для депротеинизации использовали 10% раствор СТАВ.

В своей работе мы исходили из того,

что многие факторы патогенности кодируются генами, входящими в состав мобильных генетических элементов, к которым относятся транспозоны, характерные для данных вариантов патогенных микроорганизмов. Поэтому определение последовательностей и синтеза олигонуклеотидных праймеров проводили по алгоритму выравнивания последовательностей ДНК транспозонов в программах Alignment Service V4.0 и GENCNER [5], а для анализа праймеров по уровню свободной энергии использовали программу OLIGO 4.0. Химический синтез специфических и произвольных праймеров был осуществлен амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U (Biosset Ltd, Новосибирск) в отделе химии природных соединений ГНЦ ВБ «Вектор». Постановку полимеразной цепной реакции осуществляли на амплификаторах «Бис» М-105 (Новосибирск) или «Терцик» (Москва). О результатах судили по размеру синтезированного фрагмента к ДНК, мигрирующего в 0,8%-м геле агарозы при силе тока 35–40 мА в течение 30–40 мин. Маркером служила ДНК рUC 18, гидролизованная эндонуклеазой AluI. Документирование полученных результатов проводили с помощью цифровой фотокамеры, секвенирование ампликонов – по двум цепочкам ДНК, используя общепринятые методики Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук и Максама-Гилберта [6,7].

Результаты исследований

Нами была сконструирована тест-система по выявлению геномной ДНК вирулентных штаммов *F. necrophorum subsp. necrophorum* с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров в гнездовой полимеразной цепной реакции. С этой целью были синтезированы две пары олигонуклеотидных праймеров, комплементарные ДНК в области, характерной для вирулентных штаммов *Fusobacterium* и отсутствующей в сопутствующей микрофлоре, такой, как стафилококки, стрептококки, микрোকки, кишечная палочка. С помощью наружных праймеров № 11 и № 22 в ПЦР синтезировали больший фрагмент. Вторую пару праймеров № 011 и № 022 применяли для синтеза меньшего фрагмента, структурно входящего в больший. Анализы считали положительными, если размер первого и второго ампликонов соответствовали ожидаемым размерам соответственно 558 и 289 н.п.

Из результатов исследований, приведенных в табл. 1, следует, что положи-

Результаты исследований на специфичность праймеров тест-системы

№ п/п	Наименование культуры	ПЦР с праймерами	
		наружными	внутренними
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Отрицательно	Отрицательно
2	<i>Staphylococcus albus</i>	Отрицательно	Отрицательно
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Отрицательно	Отрицательно
4	<i>Streptococcus epidermitis</i>	Отрицательно	Отрицательно
5	<i>Escherihia coli</i>	Отрицательно	Отрицательно
6	<i>Salmonella dublin</i>	Отрицательно	Отрицательно
7	<i>Proteus vulgaris</i>	Отрицательно	Отрицательно
8	«Чик» ГНУ ИЭВСиДВ	Положительно	Положительно
9	<i>F. necrophorum</i> , ВИЭВ-1	Отрицательно	Положительно
10	<i>F. necrophorum</i> , ВИЭВ-2	Отрицательно	Положительно
11	<i>F. necrophorum</i> , ГНУ ИЭВСиДВ	Отрицательно	Положительно
12	Дистиллированная вода	Отрицательно	Отрицательно

тельные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК возбудителя *F. necrophorum subsp. necrophorum*. Анализы были отрицательными, когда использовали ДНК *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *B. subtilis*, *Salmonella dublin*. Расчет концентрации ДНК осуществляли по Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук [6], ставя ПЦР с контрольной ДНК *F. necrophorum*. Чувствительность разработанного способа гнездовой ПЦР для диагностики некробактериоза составила 12,0 пг/мкл суммарной ДНК.

Проведенные ранее нами исследования позволили установить, что синтезируемый большой фрагмент ДНК *F. necrophorum* в 558 н.п. является транспозоном, кодирующим синтез фермента транспозазы и относится к мобильному району, содержащему факторы патогенности [8, 9]. Эксперименты с данной диагностической тест-системой для выяснения ее специфичности показали, что положительные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК *F. necrophorum subsp. necrophorum*. Анализы были отрицательными, когда использовали ДНК *F. pseudonecrophorum* и других бактерий.

Затем были проведены испытания данной диагностической тест-системы в сравнении с бактериологическими и биологическими методами исследования одних и тех же образцов патологического материала, отобранного от животных, подопреваемых в заболевании некробактериозом.

С этой целью поступившие для исследования пробы биоматериала делили на две части и нумеровали однозначными номерами-шифрами. Одну часть образцов исследовали в лаборатории некробактериоза животных согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза» (Москва, ГУВ Госагропрома СССР, 01.06.1987 г.). Другую часть этих же образцов под номерами-шифрами передавали в лабораторию генной инженерии, где проводили исследования с помощью гнездовой ПЦР согласно разработанному временному наставлению с использованием в качестве контролей культур *Fusobacterium necrophorum*: ВИЭВ-1, ВИЭВ-2, ГНУ ИЭВСиДВ и дистиллированной воды. Согласно результатам комиссионного испытания, приведенным в табл. 2, представленная для апробации тест-система гнездовой ПЦР для выявления ДНК патогенных *F. necrophorum* обладает высокой специфичностью и превосходит метод бактериологического исследования по времени, затраченному для выявления возбудителя заболевания в 4-10 раз.

Проводя исследования, мы обратили внимание на то, что в большинстве случаев, где были животные с хроническим инфицированием *F. necrophorum*, визуализируется только внутренний фрагмент ДНК после использования двух пар праймеров. Исключение составляли случаи острого заболевания некробактериозом (без медикаментозного вмешательства), при которых после проведения ПЦР с наружными праймерами визуализировался больший фрагмент. Однако после нескольких

пассажей на печеночной среде культуры *Fusobacterium* утрачивали это качество и визуализировались только после проведения дополнительно ПЦР с внутренними праймерами. Это ориентировало на малое число копий тестируемого фрагмента в полной последовательности ДНК *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum*.

По результатам испытаний были разработаны инструкция по применению тест-системы для выявления *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР)

с помощью гнездовых праймеров и технические условия. Тест-система успешно прошла государственные комиссионные испытания в 2005–2006 гг.

Заключение

В результате выполненной работы диагностическая тест-система, обладающая специфичностью и позволяющая с помощью гнездовых праймеров в полимеразной цепной реакции выявлять из биологических образцов патогенный биотип *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum*. На данную тест-систему, прошед-

Таблица 2

Результаты межлабораторных комиссионных исследований биологических образцов на некробактериоз

№ проб	Исследуемый материал	Бактериологическое и биологические исследования		ПЦР с праймерами	
		питательные среды и биопроба	получена чистая культура от мышей	наружные	внутренние
1	Фаланга 1	+	+	-	+
2	Фаланга 2	+	-	-	+
3	Ф. некроф. из коллекц.	+	-	-	+
4	Костн. мозг фаланги	+	+	+	+
5	Абсцесс печени 1	+	-	-	-
6	Абсцесс печени 2	+	-	-	-
7	Абсцесс печени 3	+	+	-	-
8.	Ф. некроф. лиоф. ВИЭВ-1	+	н/и	-	+
9	Ф. некроф. лиоф. ВИЭВ-2	+	н/и	-	+
10	Фаланга 3	+	-	-	+
11	Кровь фаланги	+	-	-	+
12	Фаланга 4	+	+	-	+
13	Фаланга 5	+	+	-	+
14	Абсцесс мышц	+	-	-	+
15	Некрот. очаг от мыши	+	-	-	+
16	Ф. некроф.	+	+	-	+
17	Биоматериал от мыши	+	-	+	+
18	Стенка рубца	-	-	-	-
19	Содержимое рубца	-	-	-	-
20	Фаланга 6	+	-	-	+
21	Фаланга 7	+	-	-	+
22	Фаланга 8	+	-	-	+
23	Копытцевый рог	-	-	-	-
24	Навоз	-	-	-	-
25	Фаланга 9	+	+	-	+
26	Фаланга 10	+	+	-	+

Примечание: н/и – не исследовали «+» – наличие *F. necrophorum*, «-» – отсутствие *F. necrophorum*

шую государственные испытания, были получены нормативные документы: «Инструкция по применению тест-системы для выявления *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* методом полимеразной

цепной реакции (ПЦР) с помощью гнездовых праймеров» и Технические Условия на эту тест-систему ТУ 9388-001-05095732-2006 (Россельхознадзор, регистр. № ПВР-1-2.6/01846 от 20 февраля 2007 года).

SUMMARY

The characteristic of the developed test - system for revealing *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* by a method polymerase chain reaction (PCR) with the help nested primers.

Литература

1. Nicholson L.A. Phylogenetic relationship of *Fusobacterium necrophorum* A, AB, and B biotypes based upon 16S rRNA gene sequence analysis/ L.A. Nicholson, C.J. Moppow, L.A. Corner et al.// Int. J. Svst. Bacteriol. – 1994. – Vol. 44. – № 2. – P.315–319.
2. Самолов А.А. *Fusobacterium necrophorum*: морфологические, биологические свойства, классификация/ А.А. Самолов //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве: Сб. науч. тр./РАСХН. Сиб. отд-ие. ИЭВ-СибДВ. – Новосибирск, 2000. – С. 399–406.
3. Соломаха О.И. Некоторые морфологические особенности *Fusobacterium necrophorum*/ О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, И.Б. Павлова// Аграрная Россия.– 2000. – № 3. – С.59–61.
4. Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза. (Утвер. ГУВ Госагропрома СССР 1 июня 1987 г.).– М. – 1987.
5. Resenchuk S.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length/ S.M. Resenchuk , V.M. Blinov // Comput. Appl. Biosci. – 1995. – № 11. – P.7–11.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // Молекулярное клонирование. – 1984. – С. 205–240.
7. Махам Ф.М., Gilbert W. In: Methods in Enzymology. – 1980. – Vol. 65. – Part. I. – P. 499–550.
8. Семенихин В.И., М.А. Филипенко, Н.В.Некрасова, Е.А. Храпов, А.А. Самолов. Генотипирование патогенного биотипа АВ *Fusobacterium necrophorum necrophorum subsp. necrophorum*/ В.И. Семенихин, М.А. Филипенко, Н.В.Некрасова, Е.А. Храпов, А.А. Самолов. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2003, – № 1. – С.86–90.
9. Семенихин В.И. Транспозоны в передаче патогенных свойств *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* биотипа АВ/, А.С. Донченко, В.М. Блинов, Д.В. Сараев, А.А. Самолов, С.В. Лопатин // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2003. – № 4. – С. 84–87.

УДК: 619:616.98:579.882.11:616-076

М.А. Шибаев, С.А. Дудников, Л.Б. Прохвятилова

(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»)

г. Владимир)

ВЫЯВЛЕНИЕ CHLAMYDOPHILA PECORUM С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ: ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ

Введение

Хламидиозы – заболевания, обусловленные представителями семейства *Chlamydiaceae* (хламидии), характеризующиеся широким спектром патогенности для разных видо-возрастных групп позвоночных, принадлежащих практически ко всем филогенетическим ветвям, и значительной вариацией форм инфекционного процесса (от бессимптомного носительства до острой манифестной инфекции) и клинических форм: энцефалитной, конъюнктивальной, респираторной, кардиоваскулярной, гастроэнтеральной, генитальной и др. (15, 3, 23).

Хламидии - группа грамотрицательных облигатных внутриклеточных паразитов с характерной для прокариот структурой,

имеющих общую морфологическую характеристику и схожие тинкториальные свойства (10, 3).

Согласно действующей классификации семейство *Chlamydiaceae* разделено на два рода: *Chlamydia* и *Chlamydophila*. В род *Chlamydia* входит три вида: *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia muridarum* и *Chlamydia suis*. Род *Chlamydophila* включает *Chlamydophila pecorum* (*Chl. pecorum*), *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila caviae*, *Chlamydophila pneumoniae*(7, 10).

Возбудители хламидиоза крупного рогатого скота (КРС) относятся к роду *Chlamydophila*, видам: *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila abortus* и *Chl. pecorum*.

Хламидиоз КРС, вызываемый *Chl. pe-*